

REGENERAÇÃO DE PLANTAS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L. cv CD104) A PARTIR DE EMBRIÕES MADUROS

REGENERATION OF WHEAT PLANTS FROM WHEAT (*Triticum aestivum* L. cv CD104) MATURE EMBRYOS

Adeline NEIVERTH¹
Jussara Berger da SILVA¹
Ivan SCHUSTER²
Marise Fonseca dos SANTOS¹
Eliane Cristina Gruszka VENDRUSCOLO^{1,3}

RESUMO

O primeiro passo para a aplicação de técnicas biotecnológicas é o estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração *in vitro*. O genótipo de trigo cv CD104 foi cultivado *in vitro* com o objetivo de avaliar a competência para a formação de calos e regeneração de plantas a partir de embriões maduros. Foram utilizados como explantes: embrião maduro inteiro (EI) e embrião maduro sectado (ES). Os embriões maduros foram testados em meio MS com dosagens decrescentes de regulador de crescimento (2,4-D), em três fases distintas: indução (0; 1; 2; 4; 8 mg dm⁻³), manutenção (0; 0,5; 1; 2; 4 mg dm⁻³) e regeneração (0 mg dm⁻³). Após a fase de indução, os calos foram avaliados a cada 21 dias quanto suas respostas do número de calos totais formados; tamanho de calos; número de embriões germinados; número de pontuações verdes (embrióides) por calo, número de plântulas regeneradas e dos índices comparativos relacionados à embriogênese e regeneração. Embora a concentração de 8 mg dm⁻³ tenha resultado nas melhores respostas em termo de indução de calos, a concentração de 1 mg dm⁻³ apresentou as melhores respostas para o número de plântulas obtidas e para eficiência regenerativa em ambos, EI e ES. Em relação ao tipo de explante, o ES apresentou os melhores resultados para a capacidade de indução calos em todas as concentrações, e o EI apresentou os melhores resultados para razão entre plântulas obtidas e embriões maduros resgatados, e eficiência regenerativa.

Palavras-chave: indução de calos; eficiência regenerativa; embriogênese somática; *Triticum aestivum*.

ABSTRACT

The first step in the application of biotechnology techniques is the establishment of an efficient plant regeneration protocol. The genotype cv CD104 was cultivated *in vitro* to evaluate ability in calli induction and plantlets regeneration from mature embryos. Two types of explants were used: whole mature embryo (EI) and bi-sected mature embryo (ES). The explants were cultivated in MS medium with decreasing doses of growth regulator (2,4-D), in three distinct phases: induction (0; 1; 2; 4; 8 mg dm⁻³), maintenance (0; 0,5; 1; 2; 4 mg dm⁻³) and plant regeneration (0 mg dm⁻³). After induction, calli were evaluated every 21 days according to their responses of somatic embryogenesis: number of induced calli, calli size, number of germinated embryos, number of calli with green spots and number of regenerated plantlets. Besides the 8 mg dm⁻³ of 2,4-D produced the best responses in terms of calli induction, the concentration of 1 mg dm⁻³ showed the best results to the number of plantlets obtained and regenerative efficiency in both EI and ES. Regarding the type of explant, the ES had the best results in terms of ability in calli induction at all concentrations while the EI showed the best results obtained for plantlets regenerated and regenerative efficiency.

Key-words: callus induction; plant regeneration efficiency; somatic embryogenesis; *Triticum aestivum*.

¹ Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2153, 85950-000, Palotina, Paraná, Brasil. E-mail: adelinen2000@yahoo.com.br; dress_16@hotmail.com; marise@ufpr.br

² Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola Ltda (COODETEC), BR 367, KM 98, CP. 301, 85813-450, Cascavel, Paraná, Brasil. E-mail: ivan.schuster@pq.cnpq.br

³ Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Campus Palotina, 2153, 85950-000, Palotina, Paraná, Brasil. E-mail: vendruscolo@ufpr.br. Autor para correspondência.

INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é um dos mais importantes cereais no mundo. Cerca de dois terços da população mundial tem o trigo e seus derivados como base de sua dieta alimentar diária, sendo uma das principais fontes de calorias e proteínas na dieta humana (Jones, 2005). O trigo possui uma produção anual de cerca de 650 milhões de t ano⁻¹ (Folha Online, 2008) e, estudiosos estimaram que a produção de trigo para o ano de 2020 deverá crescer em 40% para atender a demanda mundial (William et al., 2005).

A regeneração de plantas de trigo pode ser obtida por diversas fontes de explante: meristemas apicais (Viertel & Hess, 1996); sementes (Gosch-Wackerle et al., 1979); inflorescências (Redway et al., 1990); folhas jovens (Zamora & Scott, 1983); anteras (Brisibe et al., 2000), nós caulinares (Sharma et al., 2007) e embriões imaturos (Machii et al., 1998).

Um dos critérios para o uso de técnicas biotecnológicas, como a transformação genética é a existência de um sistema eficiente de cultura de tecidos (Shewry & Jones, 2005). Na literatura, o embrião imaturo é considerado o explante mais adequado para a promoção de calogênese e embriogênese somática de cereais, especificamente para o trigo (Wu et al., 2003; Pellegrineschi et al., 2004; Turhan & Baser, 2004). No entanto, o uso de embriões imaturos possui uma série de inconvenientes como a exigência do cultivo de plantas-estoque até o 15º dia após antese, o que consome tempo e recursos financeiros num programa de melhoramento (Turhan & Baser, 2004; Tang et al., 2006).

Embora os embriões maduros (sementes maduras), estejam disponíveis ao longo do ano, podendo ser armazenados, sem a necessidade do plantio de plantas estoque, no entanto, o problema do seu uso é a baixa frequência obtida para a calogênese e regeneração de plantas (Sears & Deckard, 1982; Turhan & Baser, 2004; Rahman et al., 2008). O estabelecimento de um protocolo eficiente de regeneração a partir de embriões maduros certamente contribuirá para a redução do tempo e custo na aplicação de técnicas biotecnológicas como a transformação genética de plantas (Machii et al., 1998; Pellegrineschi et al., 2002; Jones, 2005).

Poucos trabalhos usando embrião maduro e avaliando as respostas dos genótipos de trigo nacionais são encontrados na literatura (Dornelles et al., 1997; Vendruscolo et al., 2008). Portanto, o objetivo deste trabalho foi de estabelecer um protocolo de regeneração a partir de embriões maduros, inteiros e sectados, com o genótipo CD 104 (COODETEC/Cascavel-Pr), verificando as dosagens do regulador de crescimento 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) mais adequadas para a indução da embriogênese e regeneração de plântulas e o efeito da exposição à maior área pela secção dos embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

O genótipo de trigo (*Triticum aestivum* L.) utilizado foi o CD 104 proveniente do programa de melhoramento da COODETEC (Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola Ltda), que se caracteriza por ser um genótipo responsivo quando o explante usado é o embrião imaturo (Vendruscolo et al., 2008).

Para a obtenção de plantas regeneradas a partir de sementes maduras de trigo foram testados como explantes: embriões maduros inteiros (EI) e embriões maduros sectados (ES), cortados ao meio, com aproximadamente 1 mm cada, seguindo os protocolos de Chen et al. (2006) e Tang et al. (2006), respectivamente. As etapas de indução de calos e obtenção de plântulas regeneradas estão demonstradas na Figura 1. Os explantes utilizados foram embriões maduros com cerca de 2 à 3 mm (Figura 1A e 1B).

Para a desinfestação, as sementes maduras foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio a 20% (v/v) contendo uma gota de Tween-80 por 5 min, sendo enxaguadas 6 vezes em água destilada e autoclavada. Em seguida, as sementes foram armazenadas na geladeira, imersas em água destilada e autoclavada, por 16 h. Após este período, as sementes foram imersas em etanol 75% (v/v) por 5 min e depois lavadas 3 vezes em água destilada e autoclavada, sendo posteriormente secadas em papel de filtro. Todos os procedimentos de desinfestação foram realizados em câmara de fluxo laminar.

Os embriões foram excisados das sementes com auxílio de um esteromicroscópio em câmara de fluxo laminar e então, transferidos para meio MS (Murashige & Skoog, 1962) solidificado com 3,0 g dm⁻³ de Phytigel® e complementado com 30 g dm⁻³ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 e posteriormente autoclavado por 20 min a 0,1 MPa. As dosagens do regulador de crescimento (2,4-D) usadas foram: meio de indução: 8; 4; 2; 1 e 0 mg dm⁻³ de 2,4-D; meio de manutenção com a metade da concentração de 2,4-D, sendo: 4; 2; 1; 0,5 e 0 mg dm⁻³ e meio de regeneração com ausência de 2,4-D para todos os tratamentos. O tempo necessário para a passagem de uma etapa para outra (indução, manutenção e regeneração) foi de 21 dias.

No tratamento com explante EI, foram dispostos 10 embriões por placa e 9 placas para cada concentração de 2,4-D com três repetições gerando um total de 27 placas. Cada placa foi considerada como unidade experimental. Para o explante ES, foram utilizados 10 embriões por placa, cada um destes foi sectado ao meio gerando 20 fragmentos por placa, 9 placas para cada concentração e três repetições, gerando 27 placas.

Em todas as etapas do cultivo, a temperatura permaneceu em torno de 25 °C na sala de crescimento. Nas fases de indução os embriões permaneceram os 7 primeiros dias no escuro e o restante dos dias da fase de indução, fase de manutenção e regeneração, permaneceram num

fotoperíodo de 16 h luz/ 8 h escuro com uma intensidade luminosa de $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Houve sub-cultivo dos calos a cada 21 dias e foram realizadas avaliações quanto ao número de calos primários, número de pontuações verdes por calo e plântulas regeneradas, o número de embriões germinados e o tamanho dos calos a cada sub-cultivo nas respectivas fases.

Foram avaliados também os índices embriogênicos e regenerativos: a porcentagem de indução de calos primários foi calculada em função do número de calos induzidos a partir do número de embriões dispostos na placa. Foi calculado também, o índice de plântulas regeneradas obtido pela razão entre o número de plântulas originadas e o número de calos induzidos. A capacidade

embriogênica foi obtida pela razão entre o número de pontos verdes em função do número de calos induzidos por placa para cada concentração. A eficiência de regeneração foi calculada pela multiplicação entre as eficiências de indução e razão de plântulas obtidas por calos induzidos para cada tratamento. Para fins de análise, utilizou-se as médias por placa.

Para avaliar as diferenças entre a concentração de 2,4-D e tipos de explantes realizou-se a análise de variância, considerando 2,4-D e modalidades de explantes como tratamentos e, as placas, como repetições num fatorial 2X5, aplicando-se o teste Tukey a 5% para diferenciar as médias por meio do programa estatístico Genes (Cruz, 2001).

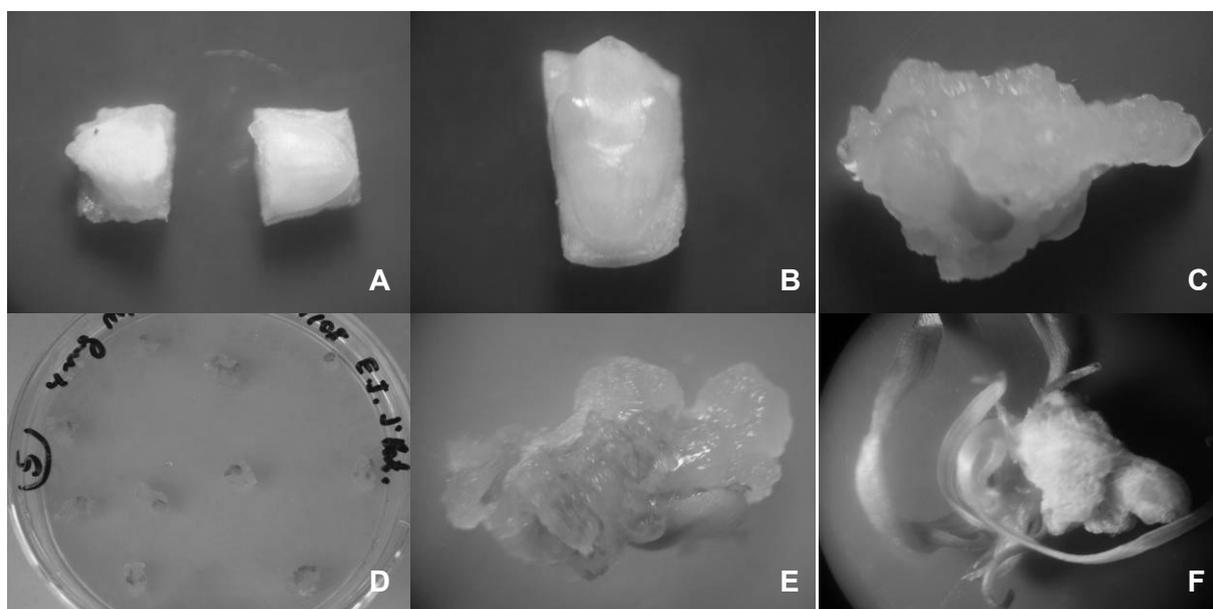


FIGURA 1 - Etapas na regeneração de plantas de trigo a partir do plantio *in vitro* de embriões maduros. (A) embrião de trigo maduro sectado, Barra = 1 mm; (B) embrião de trigo maduro inteiro, Barra = 2 mm; (C) calo primário induzido de trigo maduro aos 21 dias de cultivo; (D) placa contendo calos induzidos em meio de manutenção; (E) calo embriogênico aos 42 dias de cultivo; (F) plântula de trigo regenerada após ser transferida para meio de regeneração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A iniciação da formação de calos foi observada a partir de 8 dias após os embriões terem sido dispostos no meio de cultura, para ambos os tipos de explante (Figura 1C e 1D). Os calos embriogênicos (com pontuações verdes) foram observados no meio de manutenção a partir do 42º dia para ambos EI e ES (Figura 1E). As plântulas foram observadas no meio de regeneração após 63 dias de cultivo tanto em EI como em ES (Figura 1F). As concentrações de 2,4-D avaliadas foram 0; 1; 2; 4 e 8 mg dm^{-3} . Outros autores, avaliando o efeito da concentração do 2,4-D na cultura *in vitro* de embrião maduro de trigo, testaram concentrações variando de 1,5 a 4 mg dm^{-3} (Malik et al., 2004); 4-8 mg dm^{-3} (Turhan & Baser,

2004); 4-6 mg dm^{-3} (Rahman et al., 2008) e 2 e 8 mg dm^{-3} (Chen et al., 2006).

Não ocorreu a indução de calos, calos apresentando pontos verdes e plântulas regeneradas avaliados no controle (0 mg dm^{-3}) entre os tratamentos ES e EI, evidenciando a necessidade do regulador de crescimento para a regeneração de plantas a partir deste tipo de explante (Figura 2). Em relação à porcentagem de calos obtidos por placa, os tratamentos EI e ES diferiram estatisticamente quanto a porcentagem de calos obtidos nas concentrações de 1 e 2 mg dm^{-3} , evidenciando maiores valores para ES, porém para as concentrações de 4 e 8 mg dm^{-3} não houve diferença estatística entre estes tratamentos (Figura 2).

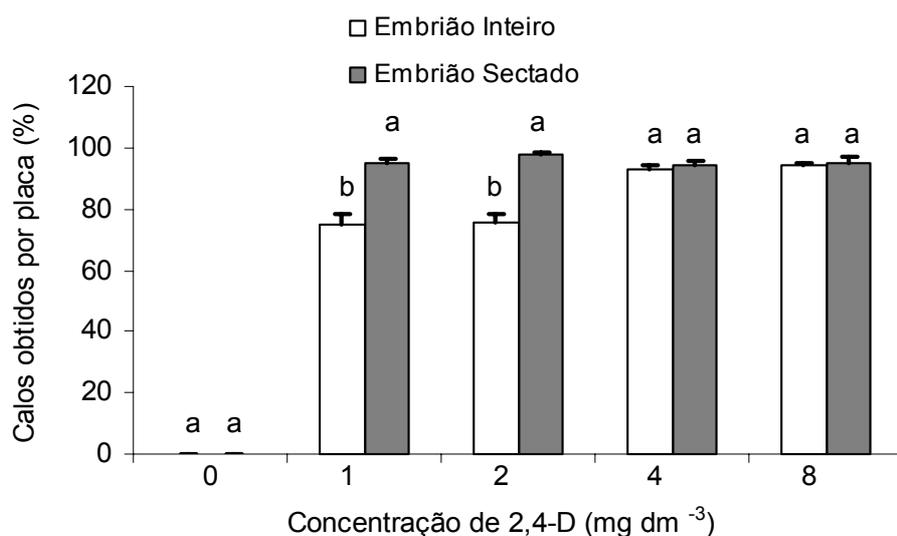


FIGURA 2 – Porcentagem de calos obtidos (por placa) para EI e ES, nas diferentes concentrações de 2,4-D. Letras iguais representam resultados estatisticamente iguais, comparando-se os tratamentos separadamente.

Em relação ao número de pontos embriogênicos (pontuações verdes) por calo (Figura 3), a melhor concentração de 2,4-D foi 1 mg dm⁻³, com valores médios entre 32 e 57 pontos embriogênicos (pontos verdes) por calo induzido e, à medida que a concentração deste regulador de

crescimento aumentou houve um decréscimo no número de calos mostrando a sensibilidade do explante a este regulador de crescimento. Esta tendência foi observada em ambos os tratamentos (EI e ES) (Figura 3).

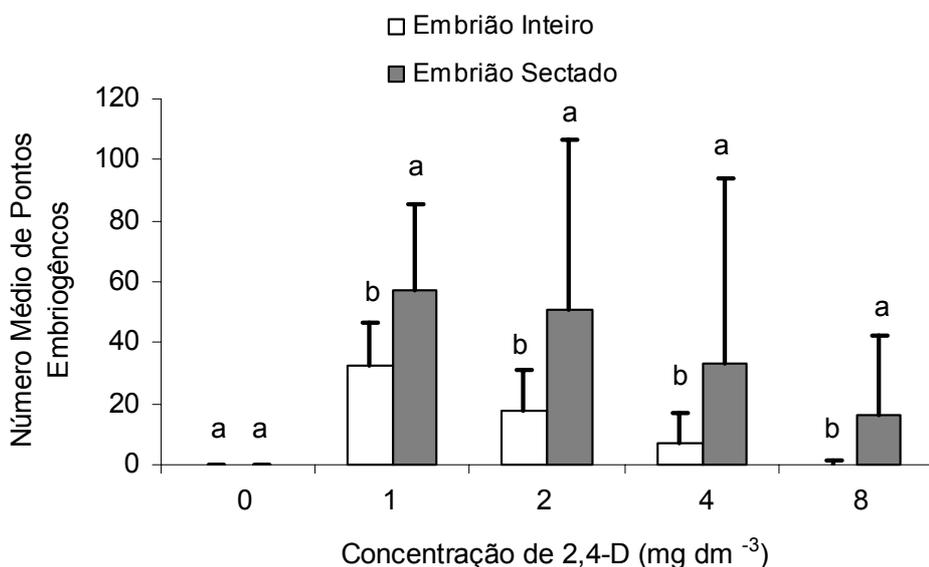


FIGURA 3 - Número médio de pontuações verdes em calos obtidos observadas de EI e ES cultivados nas diferentes concentrações de 2,4-D. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão (n=27). Letras iguais representam resultados estatisticamente iguais, comparando-se os tratamentos separadamente.

Ainda, evidenciou-se a superioridade do tratamento ES para a capacidade embriogênica com calos em maior número e estatisticamente diferentes de EI (Figura 3). Não foi obtido nenhum calo embriogênico na concentração de 8 mg dm⁻³ (EI), enquanto que na mesma concentração o tratamento ES obteve 16,5 calos embriogênicos em média, o que demonstra uma resposta positiva à maior exposição de superfície do explante ao regulador de crescimento.

Para a regeneração de plantas, a concentração de 1 mg dm⁻³ de 2,4-D foi a que melhor respondeu em ambos os tratamentos EI e ES, sendo que em EI foi obtido 1,5 plântulas em

média, comparado às 0,8 plântulas do tratamento ES, sendo as médias estatisticamente diferentes (Figura 4). Inversamente, foi observada na concentração de 2 mg dm⁻³, com 0,6 plântulas regeneradas no ES e 0,03 plântulas em EI. Com 4 mg dm⁻³ os tratamentos EI e ES não diferiram estatisticamente e na concentração de 8 mg dm⁻³ não houve a formação de plântulas, mostrando o efeito inibitório do 2,4-D sobre o explante. Tais resultados permitem concluir que maiores níveis de 2,4-D inviabilizaram a regeneração tanto para EI como para ES (Figura 4).

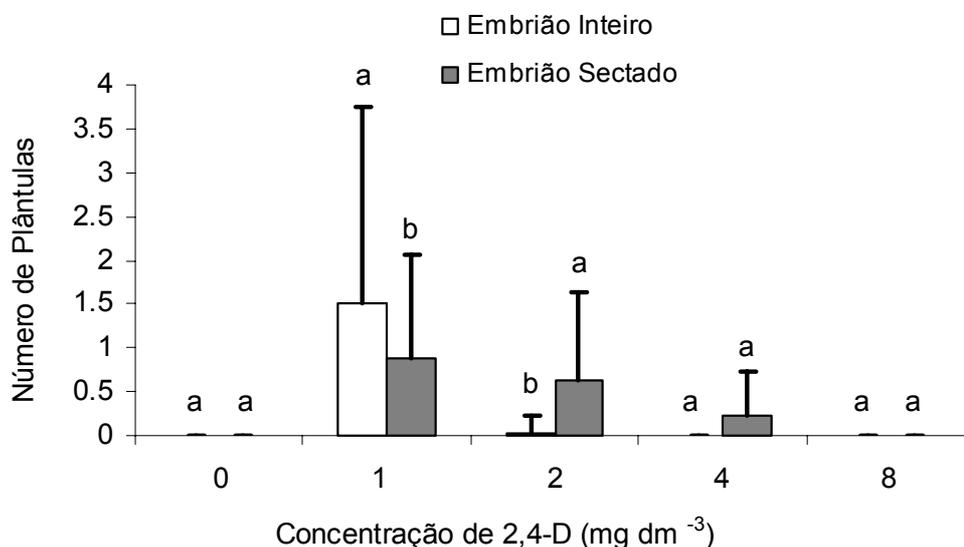


FIGURA 4 - Número médio de plântulas obtidas por placa, observadas para EI e ES nas diferentes concentrações de 2,4-D ao final do ciclo do meio de regeneração. Os valores apresentados correspondem à média \pm desvio padrão (n=27). Letras iguais representam resultados estatisticamente iguais, comparando-se os tratamentos separadamente.

A porcentagem de germinação, isto é, o número de embriões maduros que germinaram foi de 95% no EI e 74% no ES na concentração de 0 mg dm⁻³ de 2,4-D. A provável explicação seria a ausência de 2,4-D no meio de cultura regulando a diferenciação celular levando à calogênese. Nas concentrações de 1 mg dm⁻³, os valores foram de 24% e 5% para EI e ES, respectivamente. Para as

concentrações de 2 mg dm⁻³, os valores foram de 24 e 2%; 4 mg dm⁻³ (7 e 6%) e 8 mg dm⁻³ (2 e 1%) para EI e ES, respectivamente. Tais resultados demonstram que a secção do explante reduz a taxa de germinação propiciando um maior número de calos e plântulas regeneradas (Figura 5).

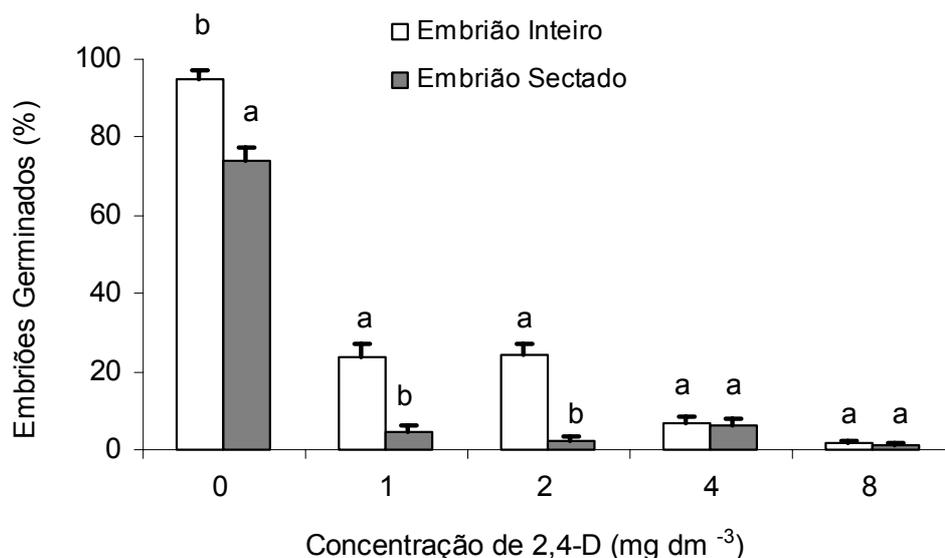


FIGURA 5 - Percentual de embriões de trigo maduro que germinaram nas diferentes concentrações de 2,4- D para EI e ES. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão (n=27). Letras iguais representam resultados estatisticamente iguais, comparando-se os tratamentos separadamente.

Com relação ao tamanho dos calos (diâmetro em cm), em todas as concentrações de 2,4-D, o tamanho dos calos do tratamento EI foram significativamente maiores comparados aos calos do tratamento ES, sendo que as médias de EI foram de 0,4 a 0,6 cm, enquanto as médias do

tratamento ES foram de 0,3 a 0,4 cm, nas diferentes concentrações de 2,4-D (Figura 6). Os dados obtidos concordam com médias de tamanho obtidas na dosagem de 4 mg dm⁻³ de 2,4-D por Rahman et al. (2008).

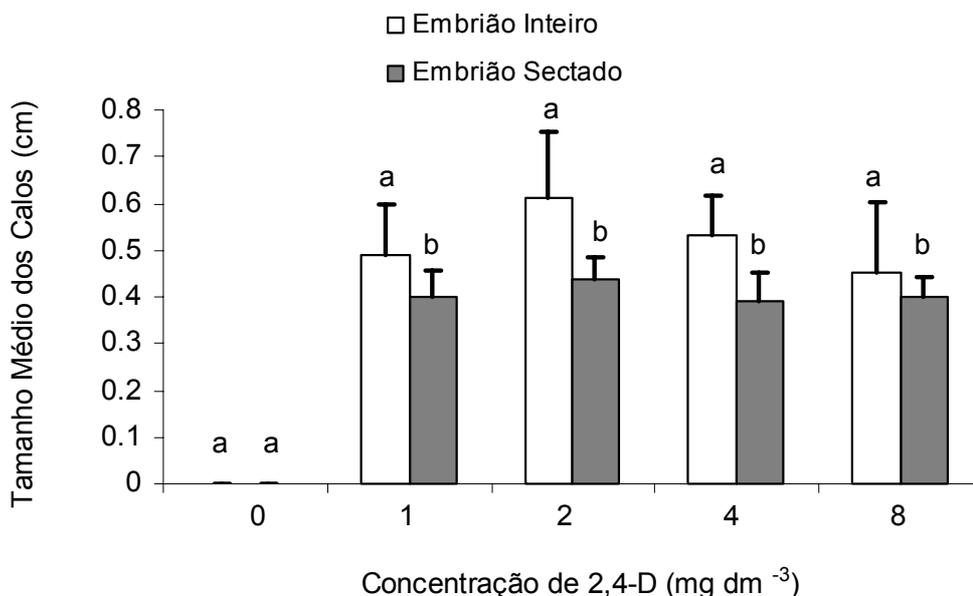


FIGURA 6 – Tamanho médio dos calos observados para EI e ES, nas diferentes concentrações de 2,4- D, quando transferidos para o meio de manutenção. Os valores apresentados correspondem à média ± desvio padrão (n=27). Letras iguais representam resultados estatisticamente iguais, comparando-se os tratamentos separadamente.

Ocorreram diferenças nos índices embriogênicos e regenerativos: indução de calos, razão entre plântulas e eficiência regenerativa entre EI e ES (Tabela 1). Em relação à indução de calos, o tratamento ES foi o que proporcionou o maior número (94 a 97%) enquanto que o tratamento EI obteve valores entre 75 a 94%, isto deve-se em parte, ao fato de que no tratamento ES os embriões foram sectados ao meio, gerando assim o dobro de calos por placa comparado ao

tratamento EI. Diversos autores citados na literatura relatam sobre diferentes porcentagens de indução de calos obtidos em seus trabalhos utilizando o mesmo tipo de explante, porém com genótipos diferentes do avaliado neste experimento: 2,1 a 10% (Rahman et al., 2008); 70,9 a 93% (Tang et al., 2006); 25,6 a 57,6% (Nasircilar et al., 2006); 0 a 88% (Turhan & Baser, 2004).

TABELA 1 – Valores médios de indução de calos primários, regeneração de plântulas e eficiência regenerativa, do genótipo CD104 em diferentes concentrações de 2,4-D.

Concentrações de 2,4-D (mg dm ³)	Indução de Calos (%)		Razão entre Plântulas Obtidas/ Calos Induzidos		Eficiência de Regeneração (%)	
	EI	ES	EI	ES	EI	ES
0	0	0	0	0	0	0
1	75	95	0,2	0,05	15	4
2	75	97	0,04	0,03	3	2
4	93	94	0	0,01	0	1
8	94	95	0	0	0	0

EI – embrião maduro inteiro

ES – embrião maduro sectado

A influência das auxinas na regeneração de trigo parece ser genótipo dependente (Przetakiewicz et al., 2003; Kisgyörgy et al., 2008). Pellegrineschi et al. (2002) ao testar linhagens do genótipo Bobwhite verificou respostas diferenciadas das mesmas sob condições de cultivo similares. Uma provável explicação para o efeito do genótipo na regeneração podem ser os níveis de reguladores de crescimento endógenos presentes no embrião (Jiménez & Bangerth, 2001).

Outros fatores como: tipo de explante, diferentes níveis de reguladores de crescimento e composição do meio podem também diferenciar a resposta à embriogênese e regeneração de plantas (Fennel et al., 1996; Kisgyörgy et al., 2008).

Em relação ao índice de plântulas regeneradas obtidas (Tabela 1), o tratamento EI gerou o maior número médio de plântulas regeneradas (0,2) especificamente na concentração de 1 mg dm⁻³ e somente 0,04 na concentração de 2 mg dm⁻³. Vendruscolo et al., (2008) relatam valores de 0,7 plântulas para a cultivar CD104 com 2 mg dm⁻³ de 2,4-D na fase de indução mas utilizando embriões imaturos, mostrando uma diferença significativa no uso desse tipo de explante. Dornelles et al. (1997) com genótipos da Embrapa obtiveram 1,91 plântulas em concentrações de 4 mg dm⁻³ de 2,4-D. Em relação ao tratamento ES, os dados demonstram valores menores, porém encontrados em três diferentes concentrações (Tabela 1).

Quanto à eficiência regenerativa para ambos

os tratamentos, os valores obtidos variaram de 0 a 15% (Tabela 1). Esses valores são considerados similares aos obtidos por Chen et al. (2006), que relatam eficiências regenerativas de 3,3 a 13,6% para concentrações de 2 mg dm⁻³ de 2,4-D e 5,2 a 21,7% para 8 mg dm⁻³, ambas eficiências relacionadas ao cultivo de EI mas com diversos genótipos sendo avaliados.

Chen et al. (2006) comentam que o processo de desdiferenciação do embrião maduro é um processo complexo onde podem estar envolvidos genes com padrões de expressão gênica que mudam o destino da célula. A exposição às altas concentrações de auxinas podem causar mudanças no programa de desenvolvimento celular normal o que explicaria que concentrações maiores que 2 mg dm⁻³ resultaram em eficiência regenerativa nula.

Os resultados obtidos demonstraram a grande diferença existente entre embrião maduro e imaturo no genótipo CD104, indicando que o último ainda é mais eficiente para a indução de calos e regeneração de plantas.

CONCLUSÕES

Conclui-se que há uma resposta diferenciada do genótipo CD104 quanto à presença de diferentes concentrações de 2,4-D em duas diferentes modalidades de explante (EI e ES). A concentração de 1 mg dm⁻³ de 2,4-D no meio de cultivo promoveu as melhores respostas em termos de número de plântulas obtidas e eficiência

regenerativa em ambos EI e ES. Altas concentrações de reguladores de crescimento presentes no meio de cultivo reduziram a eficiência regenerativa. Quanto à realização da secção, esta somente foi interessante se a finalidade for a indução de calos e para a regeneração o EI foi o que resultou melhores índices.

AGRADECIMENTO

À Coodetec, pelo fornecimento das sementes.

REFERÊNCIAS

1. BRISIBE, E. A. et al. Cytodifferentiation and transformation of embryogenic callus lines derived from anther culture of wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 343, p. 187-196, 2000.
2. CHEN, J. Y. et al. Study on plant regeneration of wheat mature embryos under endosperm-supported culture. **Agriculture Sciences in China**, v. 5, n. 8, p. 572-578, 2006.
3. CRUZ, C. D. **Programa GENES**: versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 2001. 648 p.
4. DORNELLES, A. L. C. et al. Callus induction and plant regeneration by Brazilian triticale and wheat genotypes. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 1997.
5. FENNEL, S. et al. Plant regeneration from immature embryos of 48 elite CIMMYT bread wheats. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, n. 2, p. 163-169, 1996.
6. FOLHA ONLINE. **Safra mundial recorde de trigo pode atenuar crise de alimentos, diz estudo (30/05/2008)**. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/folha/dinheiro/ult91u407151.shtml>>. Acesso em: 24 fev. 2009.
7. GOSCH-WACKERLE, G.; AVIVI, L.; GALUN, E. Induction, culture and differentiation of callus from immature rachises, seeds and embryos of *Triticum*. **Zeitung Pflanzenphysiologi**, v. 91, p. 267-278, 1979.
8. JIMÉNEZ, V. M.; BANGERTH, F. Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 67, n. 1, p. 37-46, 2001.
9. JONES, H. D. Wheat transformation: current technology and applications to grain development and composition. **Journal of Cereal Science**, v. 41, n. 2, p. 137-147, 2005.
10. KISGYÓRGY, B. N. et al. Regeneration ability of wheat (*Triticum aestivum* L.) embryos after bombardment with a particle gun. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 52, n. 1, p. 127-130, 2008.
11. MACHII, H. et al. Screening wheat genotypes for high callus induction and regeneration capability and immature embryo cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 53, n. 1, p. 67-74, 1998.
12. MALIK, S. I. et al. Effect of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction from mature wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 1, p. 156-159, 2004.
13. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
14. NASIRCILAR, A. G.; TURGUT, K.; FISKIN, K. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of different wheat genotypes. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 3, p. 637-646, 2006.
15. PELLEGRINESCHI, A. et al. Identification of highly transformable wheat genotypes for mass production of fertile transgenic plants. **Genome**, v. 45, n. 2, p. 421-430, 2002.
16. PELLEGRINESCHI, A. et al. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 77, n. 3, p. 245-250, 2004.
17. PRZETAKIEWICZ, A.; ORCZYK, W.; NADOLSKA-ORCZYK, A. The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 73, n. 3, p. 245-256, 2003.
17. RAHMAN, M. M.; SHAMSUDDIN, A. K. M.; ASAD, V. *In vitro* regeneration from mature embryos in spring wheat. **International Journal of Sustainable Crop Production**, v. 3, n. 2, p. 76-80, 2008.
19. REDWAY, F. A. et al. Identification of callus types for long term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 79, n. 5, p. 609-617, 1990.
20. SEARS, R. G.; DECKARD, E. L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration. **Crop Science**, v. 22, n. 3, p. 546-550, 1982.
21. SHARMA, V. K. et al. Node-derived cultures with high-morphogenic competence in barley and wheat. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 88, n. 1, p. 21-33, 2007.
22. SHEWRY, P. R.; JONES, H. D. Transgenic wheat: where do we stand after the first 12 years. **Annual Review of Applied Biology**, v. 147, n. 1, p. 1-14, 2005.
23. TANG, Z. X. et al. The selection of transgenic recipients from new elite wheat cultivars and study on its plant regeneration system. **Agricultural Sciences in China**, v. 5, n. 6, p. 417-424, 2006.
24. TURHAN, H.; BASER, I. Callus induction from mature embryo of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p. 17-19, 2004.
25. VENDRUSCOLO, E. C. G. et al. Callus induction and plant regeneration by Brazilian new elite wheat genotypes. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 195-201, 2008.
26. VIERTTEL, K.; HESS, D. Shoot tips of wheat as an alternative source for regenerable embryogenic callus cultures. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 44, n. 3, p. 183-188, 1996.
27. WILLIAM, H. M. et al. Biotechnology applications for wheat improvement at CIMMYT. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 29, n. 2, p. 113-119, 2005.
28. WU, B. H. et al. Trait correlation of immature embryo culture in bread wheat. **Plant Breeding**, v. 122, n. 1, p. 47-51, 2003.
29. ZAMORA, A.B.; SCOTT, K.J. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. **Plant Science Letters**, v. 29, n. 2-3, p. 183-189, 1983.

Recebido em: 05/05/2009
Aceito em: 28/09/2009